

# EP131864

## Publication Title:

Aqueous protein solutions which are stable towards denaturing, processes for their preparation and their use

## Abstract:

The invention relates to aqueous solutions of proteins with a molecular weight above 8,500 daltons, which contain a compound of the formula I R<sub>2</sub>O-X<sub>n</sub>-R<sub>3</sub> (I) in which X<sub>n</sub> is a chain of n members of the formula II or III in any desired sequence, n denotes 2 to 200 and R<sub>1</sub> denotes hydrogen, methyl or ethyl, it being possible for the radicals R<sub>1</sub> to be identical or different but R<sub>1</sub> being hydrogen in at least half of the chain members, and R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are identical or different and denote hydrogen or an organic radical, to processes for their preparation and to their use. The invention furthermore relates to the use of compounds of the formula I for the pretreatment of hydrophobic surfaces to avoid adsorption of denaturing of proteins.

---

Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 131 864  
A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 84107889.2

(51) Int. Cl.4: A 61 K 37/02

(22) Anmelddatag: 06.07.84

C 07 K 3/12, C 09 K 15/06  
//C12N9/96, A61K39/395,  
A61K35/16, A61K45/02

(30) Priorität: 13.07.83 DE 3325223

(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
23.01.85 Patentblatt 85/4

(72) Erfinder: Thurow, Horst, Dr.  
Parkstrasse 20  
D-6233 Kelkheim (Taunus) (DE)

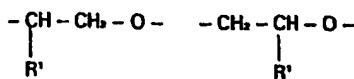
(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(54) Gegen Denaturierung beständige, wässrige Proteinlösungen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

(55) Die Erfindung betrifft wässrige Lösungen von Proteinen mit einem Molekulargewicht oberhalb 8500 Dalton, gekennzeichnet durch einen Gehalt einer Verbindung der Formel I,



in welcher X<sub>n</sub> eine Kette von n Gliedern der Formeln II oder III



A2  
864 864  
131 131  
0 0

in beliebiger Reihenfolge ist, n 2 bis 200 und R<sup>1</sup> Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeuten, wobei die Reste R<sup>1</sup> gleich oder verschieden sein können, jedoch mindestens in der Hälfte der Kettenglieder R<sup>1</sup> = Wasserstoff vorkommt und R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder einen organischen Rest bedeuten, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von Verbindungen der Formel I zur Vorbehandlung hydrophober Oberflächen zur Verminderung der Adsorption oder Denaturierung von Proteinen.

Gegen Denaturierung beständige, wäßrige Proteinlösungen,  
Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft wäßrige Lösungen von Proteinen mit einem Molekulargewicht oberhalb 8500 Dalton, die gegen Adsorption an Grenzflächen, gegen Denaturierung und gegen Präzipitation des Proteins geschützt sind, sowie Verfahren zur Herstellung solcher Lösungen. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung solcher stabilisierten Lösungen für therapeutische Zwecke vorzugsweise in Dosiergeräten zur Applikation von Arzneimitteln.

10 Es ist bekannt, daß gelöste Proteine an hydrophoben Grenzflächen (dazu gehört auch die Grenzfläche wäßrige Lösung/Luft) adsorbiert werden (C.W.N. Cumper und A.E. Alexander, Trans. Faraday Soc. 46, 235 (1950)). Proteine sind amphiphile Substanzen, d.h. sie haben sowohl hydrophile als auch 15 hydrophobe Bereiche. Die hydrophoben Bereiche bilden den Kontakt zur hydrophoben Grenzfläche.

Als Folge der Adsorption der Proteine an Grenzflächen werden verschiedene Sekundärreaktionen beobachtet. Es kann beispielweise zur "Denaturierung", d.h. zu einer Formänderung der adsorbierten Proteinmoleküle (Änderung der Tertiär- und/oder Sekundärstruktur) kommen. Daneben kann Aggregation von adsorbierten Proteinmolekülen zu löslichen oder unlöslichen polymeren Formen 25 erfolgen. So ist von vielen Proteinen eine Oberflächen-Aggregation bekannt, die sich z.B. als Trübung der Lösung oder als biologische Inaktivierung der Proteine beim Rühren oder Schütteln der wäßrigen Lösungen bemerkbar macht (A.F. Henson, I.R. Mitchell, P.R. Mussellwhite, J. Colloid 30 Interface Sci. 32, 162 (1970)). Diese Oberflächenadsorption und -aggregation ist besonders nachteilig in Apparaten zum Transport von Proteinlösungen z.B. in automatischen Dosiergeräten für Arzneimittel. In einigen Fällen kommt es auch

zu chemischen Reaktionen der adsorbierten Proteine mit gelösten Substanzen (F. MacRitchie, J. Macromol. Sci., Chem., 4, 1169 (1970)).

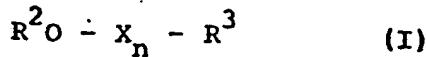
5 Die beschriebenen Grenzflächenprozesse können weiterhin einem Protein immunogene Eigenschaften (d.h. die Fähigkeit, immunologische Abwehrreaktionen in einem Organismus zu induzieren) verleihen oder bereits vorhandene immunogene Eigenschaften verstärken. Außerdem können biologische Eigenschaften, wie enzymatische, 10 serologische oder hormonelle Aktivitäten, verändert oder zerstört werden.

Eine spezielle Form der hydrophoben Grenzflächen bildet sich beim Gefrieren von wässrigen Lösungen, z.B. bei der 15 Gefriertrocknung von Proteinen. An diesen Grenzflächen kommt es ebenfalls zu den beschriebenen Denaturierungen von Proteinen (U.B. Hansson, Acta Chem. Scand., 22, 483 (1968)).

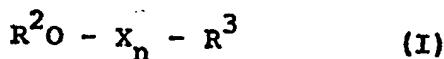
Aus der EP-A1-18609 sind wässrige Proteinlösungen bekannt, 20 die zur Vermeidung der Denaturierung der darin befindlichen Proteine an Grenzflächen eine oberflächenaktive Substanz mit kettenförmiger Grundstruktur enthalten, deren Kettenglieder mindestens zur Hälfte methyl- oder ethylsubstituierte Oxyethylen-Einheiten sind. Ferner wird die Behandlung 25 von Oberflächen mit solchen oberflächenaktiven Substanzen und deren Verwendung zur Handhabung und Reinigung von Proteinen beschrieben.

Weiterhin sind aus der WO-A1-83/00288 stabile wässrige 30 Insulinzubereitungen zur Verwendung in Insulindosiervorrichtungen bekannt, die Polyoxyethylen- $(C_8-C_{15})$ -alkylether enthalten.

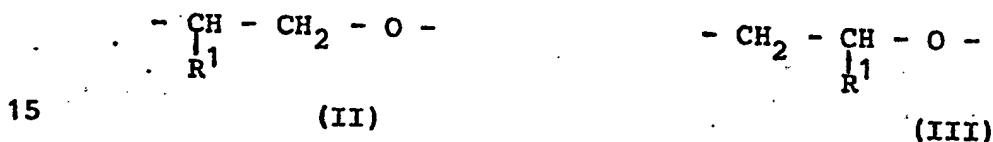
Es wurde überraschend gefunden, daß sich wässrige Lösungen 35 von Proteinen mit einem Molekulargewicht oberhalb 8500 Dalton besonders gut stabilisieren lassen durch das Zutun von Substanzen, die durch die Formel I charakterisiert werden:



Die Erfindung betrifft somit eine wässrige Lösung eines Proteins mit einem Molekulargewicht oberhalb von 8500 Dalton, die gekennzeichnet ist durch einen Gehalt einer Verbindung der Formel I,



10 in welcher  $X_n$  eine Kette von n Gliedern der Formeln II oder III



in beliebiger Reihenfolge ist, n 2 bis 200, vorzugsweise 4 bis 100, insbesondere 8 bis 50 und  $R^1$  Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeuten, wobei die Reste  $R^1$  gleich oder verschieden sein können, jedoch mindestens in der Hälfte der Kettenglieder  $R^1$  = Wasserstoff vorkommt und  $R^2$  und  $R^3$  gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder einen organischen Rest bedeuten. Bevorzugt sind solche Verbindungen der Formel I, in welcher einer der Reste  $R^2$  oder  $R^3$  für Wasserstoff steht.

25 Falls  $R^2$  bzw.  $R^3$  für einen organischen Rest steht, so wird darunter vorzugsweise ein aliphatischer Rest mit 1 bis 20 C-Atomen, ein alicyclicischer Rest mit 3 bis 10 C-Atomen, ein alicyclisch-aliphatischer Rest mit 4 bis 20 C-Atomen, eine aliphatische Estergruppe mit 2 bis 20 C-Atomen, ein aryl-aliphatischer Rest mit 7 bis 20 C-Atomen oder ein Arylrest mit 6 - 20 C-Atomen, insbesondere aber Alkyl mit 1 bis 20 C-Atomen, Alkanoyl mit 2 bis 20 C-Atomen oder Alkylphenyl mit 1 bis 10 Alkyl-C-Atomen verstanden.

35 Beispiele für die Reste  $R^2$  und  $R^3$  sind Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, oder die Reste, die sich von Laurylalkohol oder Myristalalkohol ableiten; Carboxalkylgruppen, die sich

von der Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Palmitinsäure oder Stearinsäure ableiten und Nonylphenoxy.

Stabilisierende Zusätze dieser Art haben gegenüber denen aus

5 der EP-A1-18609 bekannten Zusätzen den Vorteil, daß sie aufgrund der längeren Polyoxyethylen-Ketten ( $R^1 = H$ ) erhöhte Löslichkeit in wäßrigen Medien aufweisen. Zudem hat sich gezeigt, daß bei Zusatz von Stabilisatoren der beschriebenen Art insbesondere größere Proteine, d.h. solche mit

10 einem Molekulargewicht von mehr als 8500 Daltons, gegen Grenzflächenprozesse geschützt werden können.

15 Die erfindungsgemäßen Proteinlösungen können auch ein Gemisch mehrerer verschiedener Verbindungen der Formel I enthalten. Weiter können diesen Lösungen übliche Mittel zur Einstellung der Isotonie wie Glycerin, Natriumchlorid, Glucose oder ein ähnliches Kohlenhydrat, zur Konservierung

20 wie Phenol, Kresol oder p-Hydroxybenzoësäuremethylester, zur Pufferung des pH-Wertes wie Natriumphosphat, Acetat, Citrat, Barbital oder Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und zur Erzielung einer Depot-Wirkung zugefügt werden.

25 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung dieser stabilen Proteinlösungen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einer wäßrigen Proteinlösung eine oberflächenaktive Substanz der Formel I zusetzt.

30 Es wird angenommen, daß die erfindungsgemäßen oberflächenaktiven Substanzen in der Grenzfläche so geformt sind, daß die hydrophoben Bereiche der Blockpolymeren den Kontakt zur Grenzfläche bilden und daß die hydrophilen Polyoxyethylen-Bereiche in die wäßrige Phase ragen, so daß sie

35 direkte Wechselwirkung zwischen gelöstem Protein und Grenzfläche verhindern.

0131864

Die relativ großen hydrophilen Polyoxyethylen-Bereiche der Stabilisatoren, die wahrscheinlich in die wäßrige Phase hineinragen, bewirken möglicherweise, daß nur eine grobmaschige Beladung der Grenzfläche erreicht wird, so daß 5 kleinere Proteinmoleküle nicht an der Adsorption an die Grenzfläche gehindert werden können.

Dementsprechend eignen sich die erfindungsgemäßen Substanzen insbesondere zur Stabilisierung wäßriger Lösungen höher- 10 molekularer Proteine. Diese Proteine bestehen aus einer oder mehreren Polypeptidketten und können neben Aminosäuren noch andere Bausteine (Zucker, Lipide usw.) enthalten.

Die erfindungsgemäßen oberflächenaktiven Substanzen sind 15 allgemein geeignet zur Stabilisierung solcher gelöster Proteine, deren Molekulargewicht oberhalb 8500 Dalton liegt und die an hydrophobe Grenzfläche adsorbieren können, wie z.B. Polypeptide, globuläre Proteine und zusammengesetzte Proteine (Proteide), insbesondere Glykoproteine. 20

Als Beispiele für solche Proteine seien genannt Proteohormone wie Proinsuline, Präpoinsuline, Enzyme, wie Neuraminidase, Galactosidase, Glycosyl-Transferasen, Asparaginase, Catalase, Streptokinase, Myoglobin, sowie Proteine 25 mit anderen Funktionen wie Immunglobuline verschiedener Klassen und Spezies, Albumin, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Interleukine, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Bevorzugt sind Proteine mit einem Molekulargewicht oberhalb etwa 30 000.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der oben definierten stabilen Proteinlösungen bei der Reinigung von Proteinen durch Kristallisation, Chromatographie oder Ultrafiltration sowie deren Verwendung für therapeutische Zwecke insbesondere in Dosiergeräten wie implantierten oder 30 externen automatischen Pumpen.

Hydrophobe Oberflächen, die mit Proteinlösungen in Kontakt kommen, lassen sich vorteilhaft mit den oberflächenaktiven Substanzen der Formel I zur Vermeidung der Adsorption oder Denaturierung der Proteine vorbehandeln.

5

Die Herstellung der erfindungsgemäß zu verwendenden oberflächenaktiven Substanzen werden in an sich bekannter Weise durch kontrollierte Addition von Alkylenoxiden an Alkylen-diglykole (oder an entsprechende Hydroxyverbindungen)

10 hergestellt. Die endständige Hydroxylfunktionen können gegebenenfalls anschließend verestert oder veräthert werden. Eine allgemeine Vorschrift zur Herstellung eines geeigneten Blockpolymerisats ist in Beispiel 1a beschrieben.

15

Beispiel 1

a) In einem 30 l-Glaskolben mit Rührer, Heizbad, Rückflußkühler und einer Einrichtung zur Dosierung von Alkylenoxiden unter Stickstoff werden 152,1 g Propylenglykol und 125 g 49%ige Kalilauge vorgelegt. Durch Vakuumdestillation wird entwässert. Anschließend werden bei 120°C langsam unter Rühren nacheinander 4141 g Propylenoxid und 17170 g Ethylenoxid zugegeben. Nach beendeter Reaktion wird durch Zugabe von Milchsäure das Kaliumhydroxid neutralisiert. Durch Vakuumdestillation werden die leichtflüchtigen Anteile abgetrennt und das Produkt entwässert. Das mittlere Molekulargewicht des Produktes beträgt 8750 Dalton bei einem Gehalt an Polyoxyäthylen von 80 Gew.-% im Molekül.

30 b) 5 Proben mit jeweils 7 ml einer 0,1 %igen Lösung von

Ei-Albumin in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7 und 5 gleiche Proben mit Zusatz eines Stabilisators von 0,1 % (bezogen auf das Gewicht der Lösung) eines Blockpolymerisats bestehend aus einer linearen Kette von Polypropylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 1750 Dalton, der beidseitig jeweils 40 % Polyethylenglykol anpolymerisiert waren, wurden in 10 ml Glasampullen eingeschmolzen. Die Testlösungen wurden auf einen Test-Tube-Rotator mit mit 20 cm Abstand von der Radachse montiert und im Brutschrank bei 37°C mit 60 UpM rotiert. Die Proben ohne Stabilisator zeigten nach 5 Tagen eine starke Trübung, hervorgerufen durch denaturiertes Protein. Im Gegensatz dazu waren die Proben, die den Stabilisator enthielten, nach mehreren Monaten noch klar.

15

Beispiel 2

Proben von jeweils 7 ml einer Lösung von 5 % humaner Immunoglobuline, einer Lösung von 0,5 % Myoglobin (Pferd) und einer Lösung von 0,1 %  $\beta$ -Galactosidase und gleiche Proben mit einem Zusatz von 0,1 % (bezogen auf das Gewicht der Lösung) eines Blockpolymerisats bestehend aus einer linearen Kette von Polypropylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 1750 Dalton, der beidseitig jeweils 50 % Polyethylenglykol anpolymerisiert waren, wurden in 10 ml Glasampullen eingeschmolzen.

Die Proben wurden wie im Beispiel 1 b beschrieben bei 37°C geschüttelt. Die Proben ohne Stabilisator waren nach wenigen Tagen trüb, im Falle der  $\beta$ -Galactosidase war die enzymatische Aktivität auf weniger als 3 % des Anfangswertes abgefallen. Im Gegensatz dazu waren die Proben, die den Stabilisator enthielten, auch nach mehreren Wochen noch klar. Die enzymatische Aktivität war praktisch voll erhalten.

35

Beispiel 3

Es wurde eine Lösung hergestellt, die 1 % humane Immunoglobuline in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7, und zur Stabili-

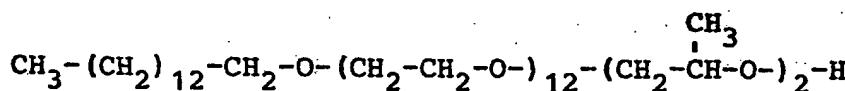
sierung 0,2 % (bezogen auf das Gewicht der Lösung) eines Blockpolymerisats bestehend aus einer linearen Kette von Polypropylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 1750 Dalton, der beidseitig 40 % Polyethylenglykol anpolymerisiert waren, enthielt.

Die Lösung wurde in ein automatisch gesteuertes Dosiergerät gefüllt. Auf einem Bewegungssimulator im Brutschrank bei 37°C förderte das Dosiergerät eine klare 10 Lösung über mehrere Wochen. In der geförderten klaren Lösung wurden die Gehalte an den Immunglobulinen gemessen. Sie stimmten mit den Anfangswerten überein.

Der Versuch wurde mit einer 1%igen Immunglobulin-Lösung, 15 die keine Stabilisator enthielt, wiederholt. Dabei entstanden Präzipitate in den Förderschläuchen des Dosiergerätes nach wenigen Tagen. Der klare Überstand enthielt nahezu keine Immunglobuline mehr.

20 Beispiel 4

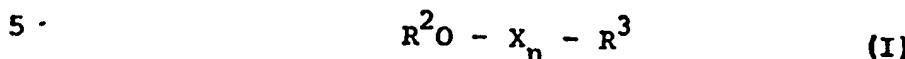
5 Proben mit jeweils 7 ml einer Lösung von 350.000 Einheiten humanem Fibroblasten-Interferon in Phosphatpuffer, pH 7, 25 und 5 analoge Proben, die zusätzlich 0,01 % (bezogen auf das Gewicht der Lösung) folgender Verbindung



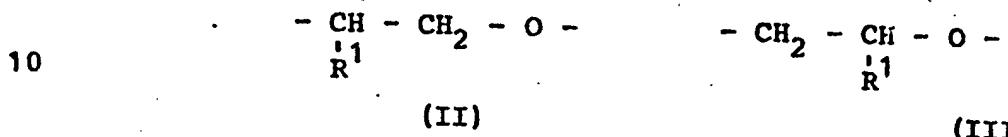
enthieilt, wurden in 10 ml Glasampullen eingeschmolzen. Die 30 Testlösungen wurden wie im Beispiel 1b beschrieben bei 37°C rotiert. In den 5 unstabilisierten Proben wurde nach 2 Tagen ein Verlust der biologischen Aktivität von mehr als 95 % gemessen. Die biologische Aktivität des Interferons in den 5 Proben, die den Stabilisator enthielten, 35 war auch nach mehreren Wochen unverändert.

Patentansprüche:

1. Wässrige Lösung eines Proteins mit einem Molekulargewicht oberhalb von 8500 Dalton, gekennzeichnet durch einen Gehalt einer Verbindung der Formel I,



in welcher  $\text{X}_n$  eine Kette von n Gliedern der Formeln II oder III



in beliebiger Reihenfolge ist,

n 2 bis 200, vorzugsweise 4 bis 100 und

15.  $\text{R}^1$  Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeuten, wobei die Reste  $\text{R}^1$  gleich oder verschieden sein können, jedoch mindestens in der Hälfte der Kettenglieder  $\text{R}^1$  = Wasserstoff vorkommt und

20.  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder einen organischen Rest bedeuten.

2. Wässrige Proteinlösung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  unabhängig voneinander Wasserstoff, einen aliphatischen Rest mit 1 bis 20 C-Atomen, einen alicyclischen Rest mit 3 bis 10 C-Atomen, einen alicyclisch-aliphatischen Rest mit 4 bis 20 C-Atomen, eine aliphatische Estergruppe mit 2 bis 20 C-Atomen, einen aryl-aliphatischen Rest mit 7 bis 20 C-Atomen oder einen Arylrest mit 6 bis 20 C-Atomen bedeuten.

30. 3. Wässrige Proteinlösung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  unabhängig voneinander Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 20 C-Atomen, Alkanoyl mit 2 bis 20 C-Atomen oder Alkylphenyl mit 1 bis 10 Alkyl-C-Atomen bedeuten.

4. Wässrige Proteinlösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ein Gemisch von mindestens zwei verschiedenen Verbindungen der Formel I enthält.

5

5. Wässrige Proteinlösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung übliche Zusätze zur Einstellung der Isotonie, zur Konservierung, zur Pufferung und/oder zur Erzielung einer Depot-Wirkung enthält.

10

6. Wässrige Proteinlösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung mindestens zwei unterschiedliche Proteine enthält.

15

7. Verfahren zur Herstellung einer stabilen Proteinlösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man einer wässrigen Proteinlösung eine oberflächenaktive Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 zusetzt.

20

8. Verfahren zur Behandlung von hydrophoben Oberflächen zur Beseitigung ihrer adsorbierenden und denaturierenden Wirkung auf Proteine dadurch gekennzeichnet, daß man die Oberflächen mit einer wässrigen Lösung einer oberflächenaktiven Substanz der im Anspruch 1 angegebenen allgemeinen Formel behandelt.

25

9. Verwendung von Lösungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 bei der Reinigung von Proteinen durch Kristallisation, Chromatographie oder Ultrafiltration.

30

10. Verwendung von Lösungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Vermeidung der Adsorption von Proteinen an hydrophoben Oberflächen.

35

0131864

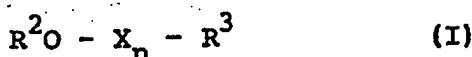
11. Wässrige Proteinlösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung für therapeutische Zwecke.
12. Wässrige Proteinlösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung in Dosiergeräten.
13. Verwendung von oberflächenaktiven Substanzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Vorbehandlung von hydrophoben Oberflächen zur Vermeidung der Adsorption oder Denaturierung von Proteinen.

**BEST AVAILABLE COPY**

- 1 -  
Patentansprüche für den Vertragsstaat AT für Österreich  
pour l'Autriche

1. Verfahren zur Herstellung einer wäßrigen Lösung eines Proteins mit einem Molekulargewicht oberhalb von 8500 Dalton, enthaltend eine Verbindung der Formel I,

5



in welcher  $X_n$  eine Kette von n Gliedern der Formeln II oder III

10



(II) (III)

in beliebiger Reihenfolge ist,

n 2 bis 200, vorzugsweise 4 bis 100 und

15

$R^1$  Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeuten,

wobei die Reste  $R^1$  gleich oder verschieden sein können, jedoch mindestens in der Hälfte der Kettenglieder  $R^1$  = Wasserstoff vorkommt und

20

$R^2$  und  $R^3$  gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder einen organischen Rest bedeuten, dadurch gekennzeichnet, daß man einer wäßrigen Proteinlösung eine oberflächenaktive Substanz der Formel I zusetzt.

25

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel I  $R^2$  und  $R^3$  unabhängig voneinander Wasserstoff, einen aliphatischen Rest mit 1 bis 20 C-Atomen, einen alicyclischen Rest mit 3 bis 10 C-Atomen, einen alicyclic-aliphatischen Rest mit 4 bis 20 C-Atomen, eine aliphatische Estergruppe mit 2 bis 20 C-Atomen, einen aryl-aliphatischen Rest mit 7 bis 20 C-Atomen oder einen Arylrest mit 6 bis 20 C-Atomen bedeuten.

30

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel I  $R^2$  und  $R^3$  unabhängig voneinander Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 20 C-Atomen, Alkanoyl mit 2 bis 20 C-Atomen oder Alkylphenyl mit 1 bis 10 Alkyl-C-

for Austria

für Österreich

pour l'Autriche

Atomen bedeuten.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man der Lösung ein Gemisch von 5 mindestens zwei verschiedenen Verbindungen der Formel I zusetzt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man der Lösung übliche Zusätze zur 10 Einstellung der Isotonie, zur Konservierung, zur Pufferung und/oder zur Erzielung einer Depot-Wirkung zusetzt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lösung mindestens zweier 15 unterschiedlicher Proteine herstellt.
7. Verfahren zur Behandlung von hydrophoben Oberflächen zur Beseitigung ihrer adsorbierenden und denaturierenden Wirkung auf Proteine dadurch gekennzeichnet, daß 20 man die Oberflächen mit einer wäßrigen Lösung einer oberflächenaktiven Substanz der im Anspruch 1 angegebenen allgemeinen Formel behandelt.
8. Verwendung von Lösungen nach einem der Ansprüche 1 bis 25 6 bei der Reinigung von Proteinen durch Kristallisation, Chromatographie oder Ultrafiltration.
9. Verwendung von Lösungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Vermeidung der Adsorption von Proteinen an hydrophoben Oberflächen. 30
10. Verfahren zur Herstellung einer wäßrigen Proteinlösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung für therapeutische Zwecke. 35
11. Verfahren zur Herstellung einer wäßrigen Proteinlösung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung in Dosiergeräten.

für *Austria* - 3 -  
für *Österreich* - 3 -  
pour *l'Autriche*.

HOL 83/01391864

12. Verwendung von oberflächenaktiven Substanzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Vorbehandlung von hydrophoben Oberflächen zur Vermeidung der Adsorption oder Denaturierung von Proteinen.